

文, 本吉慶史, 松村 剛, 西野一三, 村田美穂, 武田伸一, 川井 充: 筋ジストロフィー患者登録 (REMUDY) 希少疾病の治療に向けて. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011

15. 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノ人工核酸が筋線維に取り込まれる機構の解明. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011

【その他】

1. 武田伸一: 産官学連携医療クラスタープラン (TMC). 精神・神経疾患研究開発費「独立行政法人国立精神・神経医療研究センターにおける経営戦略企画に関わる研究」(主任研究者 藤崎清道) 平成 23 年度 企画戦略室活動報告会 (平成 23 年度 研究開発費発表会), 東京, 3.5, 2012
2. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の開発. 再生医療の実現化プロジェクト平成 23 年度成果報告会, 文部科学省科学技術委託事業・再生医療の実現化プロジェクト (研究代表者 武田伸一), 東京, 12.9, 2010
3. 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 伊藤尚基, 武田伸一: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定の試み. 精神・神経疾患研究開発費「精神・神経疾患の iPS 細胞を用いた診断・治療法の実現に関する戦略的研究」(主任研究者 荒木敏之) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.6, 2011
4. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川 基, 游智 傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一: 福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の遺伝子異常と蛋白質/細胞病態および治療に関する研究 - SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー -. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」(主任研究者 西野一三) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.5, 2011
5. 木村 円, 林 由起子, 中村治雅, 森 まどか, 小牧宏文, 西野一三, 川井 充, 武田伸一: Remudy 患者情報登録部門の現状と課題. 精神・神経疾患研究開発費「遺伝性神経・筋疾患における患者登録システムの構築と遺伝子診断システムの確立に関する研究」(主任研究者 木村 円) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
6. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田直子, 岡田尚巳: Duchenne 型筋ジストロフィー・モデル犬 CXMDJ における疾患重症度と修飾因子の解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
7. 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: ベクターを用いた筋ジストロフィー犬免疫寛容誘導療法と機能解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
8. 武田伸一, 鈴木友子, 西山尚志, 瀬川 亮, 中村美穂, 伊藤尚基: 多能性幹細胞を骨格筋へ分化誘導する低分子化合物の同定. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
9. 二川 健, 河野尚平, 安倍知紀, 越智ありさ, 近藤茂忠, 平坂勝也, 真板綾子, 奥村裕司, 東 端晃, 埜中征哉, 武田伸一: 筋萎縮における機械的ストレス感知機構の解明 - ミトコンドリアを介した無重カストレスの感知機構 -. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
10. 上住聡芳, 深田宗一朗, 山本直樹, 武田伸一, 土田邦博: 間葉系前駆細胞による筋再生制御機構の解析. 精神・神経疾患

- 研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.2, 2011
11. 福田恵一, 林地のぞみ, 湯浅慎介, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一:液性因子による変性骨格筋の再生療法の開発-G-CSFによるデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する有効性の検討-精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 12. 深田宗一郎, 山口賢彦, 米田智廣, 小久保博樹, 小川 遼, 上住聡芳, 伊藤尊仁, 辻川和丈, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一:骨格筋幹細胞移植実現を目指した基盤的研究-Hesr1/3 を介した骨格筋幹細胞の未分化性維持機構-. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.2, 2011
 13. 橋戸和夫, 岸 宗一郎, 小牧宏文, 青木吉嗣, 武田伸一:血清 microRNA 測定による筋ジストロフィー新規診断法の確立-Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清を用いた筋特異的 microRNA の量的変化-. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 14. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川 基, 遊 智傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一, 戸田達史: SVA レトロトランスポゾンによる病的エクソントラッピングと福山型筋ジストロフィーにおけるレスキュー. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 15. 武田伸一, 青木吉嗣, 永田哲也, 横田俊文, Terence Partridge: 新規アンチセンス治療法開発に向けた筋線維への核酸取り込み機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 16. 横田俊文, 青木吉嗣, 永田哲也, 中村昭則, 齊藤 崇, Kanneboyina Nagaraju, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: エクソン 45-55 マルチ・スキッピングによるジストロフィン発現誘導と治療法の開発. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 17. 関根光雄, 横内 瑛, 岡庭夏己, 正木慶昭, 原川太郎, 鈴木 真, 山田剛史, 山田 研, 大窪章寛, 清尾康志, 青木吉嗣, 永田哲也, 武田伸一: 遺伝子制御機能を持つ人工核酸の創出. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成23年度班会議, 東京, 12.1, 2011
 18. 谷口(池田)真理子, 小林千浩, 金川 基, 遊 智傑, 小田哲也, 久我 敦, 倉橋浩樹, 横田俊文, 武田伸一, 戸田達史: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. 第6回筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 19. 木村 円, 中村治雅, 林由起子, 松田 悠, 後藤加奈子, 森 まどか, 小牧宏文, 西野一三, 武田伸一, 川井 充: 筋ジストロフィー患者情報登録制度 Remudy の紹介. 第6回筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
 20. 青木吉嗣, 横田俊文, 永田哲也, 谷端 淳, 齊藤 崇, 中村昭則, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: モルフォリノを用いたエクソン 45-55 ブロックスキップにより Duchenne 型筋ジストロフィーマウスの筋病理と筋機能は改善する. 第6回筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011

21. 鈴木友子, 中村美穂, 西山尚志, 伊藤尚基, 武田伸一: 筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞の樹立と筋分化誘導実験—進捗状況と問題点—. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
22. 武田伸一: 筋ジストロフィー研究の最前線, 第 7 回国立精神・神経医療研究センター神経内科短期臨床研修セミナー, 東京, 7.13, 2011
23. 武田伸一: 筋ジストロフィー疾患患者からの特異的 iPS 細胞の樹立とその問題点, 平成 23 年度文部科学省科学技術試験研究委託事業, 再生医療の実現化プロジェクト 第 4 回夏のワークショップ, 大阪, 7.8, 2011
24. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療は、どこまで近づいているのか. 第 47 回 日本筋ジストロフィー協会 九州ブロック福岡大会, 福岡, 6.11, 2011
25. Wang B, Ito N, Ono Y, Kawaguchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Impact of age on the generation and re-differentiation of iPSCs derived from mdx muscle at different ages. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.10, 2011
26. 笠原優子, 喜納裕美, 岡田浩典, 岡田尚巳, 武田伸一: IL-10 欠損 mdx マウスの作出と病態解析. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.9, 2011
27. 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔への遺伝子導入と免疫寛容の誘導. 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 研究所発表会, 東京, 5.9, 2011
28. 武田伸一: 筋ジストロフィーの治療の最前線. 国際医療福祉大学大学院, 東京, 4.27, 2011
29. 武田伸一: TMC (トランスレーショナル・メディカルセンター) について. 平成 23 年度国立精神・神経医療研究セン

ター病院 新採用者オリエンテーション, 東京, 4.1, 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

出願

- 1) 岡田尚巳, 千代智子, 武田伸一
薬剤取り込み増強剤
特願 2012-078035, 2012 年 3 月 29 日出願
- 2) 武田伸一, 伊藤尚基, ウルスルグ, 鈴木友子
筋肥大を促進する物質又は因子のスクリーニング法
特願 2011-200716, 2011 年 9 月 24 日出願
- 3) 武田伸一, 中村昭則, 小林正典, 岡田尚巳
筋ジストロフィーの病態および治療評価のための分子マーカー
特願 2011-142312, 2011 年 6 月 27 日出願
- 4) 岡田尚巳, 武田伸一, 喜納裕美
薬剤送達粒子及びその製造方法
特願 2011-092252, 2011 年 4 月 18 日出願
- 5) 武田伸一, 永田哲也, 他 2 名
アンチセンス核酸
特願 2011-288040, 2011 年 9 月 1 日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他、特記事項

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業 (臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

ベクター系を応用した新規アンチセンス分子送達担体の開発

研究分担者 岡田 尚巳
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 室長

研究要旨

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対するエクソン・スキップ治療の効果を高めるため、アンチセンス分子を効率よく心筋や骨格筋に送達する担体の開発を、前年度に引き続き推進した。高純度 AAV ベクターや中空粒子の作製・精製技術を応用して、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を調製し、アンチセンス分子を心筋に高い効率で送達する新たな手法の開発を推進した。今年度は新たに臨床応用が可能な高分子界面活性剤を用いて、人工核酸を中空粒子に取り込ませる手法を開発し、培養細胞の系で蛍光標識モルフォリノの細胞内導入効率を検証した。また、核内局在化と持続的な効果を目的として、改変 U7snRNA に結合したアンチセンス配列を発現させる 9 型 AAV ベクターを構築した。これらの有効性を検証するため、エクソン 45-50 を欠損する DMD 患者由来細胞の不死化と、有効性の検証を行った。さらに、9 型 AAV ベクターの生体内での動態を検証するため、筋ジストロフィーに 9 型 AAV ベクターを投与し、心筋や全身骨格筋への送達効果や免疫応答を検討した。改変 U7 snRNA 発現 AAV ベクターや AAV 中空粒子は、エクソン・スキップ治療に必要なアンチセンス分子の次世代担体として、臨床応用が期待される。

A. 研究目的

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)における遺伝子変異の多くはジストロフィン遺伝子の遺伝子変異集積領域であるエクソン 45-55 に集中している。アンチセンス・モルフォリノによるエクソン・スキップ治療の有効性が期待されているが、心筋への導入効率や作用時間が不十分であることが、より高い臨床的効果を得るための大きな課題である。本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時間の発現が期待できる 9 型アデノ随伴ウイルス(AAV)を応用し、アンチセンス分子送達担体の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 改変 U7 snRNA

U7snRNA はヒストン pre-mRNA の 3'末端のプロセッシングの際に、スプライシングされるべき領域を指定するガイド RNA である。これまで、ジストロフィン遺伝子エクソン 51

のエクソン・スキップ療法臨床試験に用いられている PRO051(mA20)に対応する 20 塩基をアンチセンス配列として用いた U7snRNA 発現カセットを搭載した AAV ベクタープラスミドを構築している。この改変 U7snRNA により、MyoD を用いて筋分化させたヒト線維芽細胞 WI-38 においてエクソン 51 スキップを確認している。U7snRNA はマウス RNU7 遺伝子を元に構築されており、転写開始位置から 62-44bp 上流に存在している proximal sequence element (PSE: TCACCCTCATCGAA AGTGG)および 203-194bp 上流にある distal sequence element (DSE: GCATAGCCTT)が必須(Jacobs et. al.,1999)である。また、ガイド RNA として snRNA が機能するためには 3'末端の修飾が通常のタンパクをコードする遺伝子とは異なるため、転写の終了に snRNA 配列の終端から 14-27bp 下流の 3'box terminator sequence(3'box: GTCTACAATGAAAG)が必須 (Jacobs et. al.,1999, Egloff et. al., 2008)である。

U7snRNA 発現のために必須の最小構成は 350bp と短く、ひとつの AAV ベクターゲノム上にターゲット配列の異なる複数の U7snRNA 発現カセットを搭載することも可能である(Goyenville et. al., 2012)。一方で、RNU7 遺伝子上流にエンハンサー配列を配置する事で snRNA の発現量が変化する(Brun et al., 2003)。さらに、AAV ベクターゲノム中の 2 つある ITR のうち、一方の TRS エlement を欠損した scAAV をベクタープラスミドに用いることで、AAV ベクターによる遺伝子導入・発現効率を向上することができる。これらを元に、今回はスキップの効率を高めることを目的とした U7snRNA 発現 AAV ベクタープラスミドを改変した。また、改変 U7snRNA のスキップ効率を簡便に評価するために、エクソン 45-50 欠失があるヒト DMD 患者由来の 5017 細胞の不死化を行った。

2. モルフォリノ含有 AAV 中空粒子

AAV 中空粒子の細胞内動態を確認するために、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を作製し、これを蛍光標識した。筋分化誘導後のヒト線維芽細胞に導入し、細胞内での局在を検証した。次に、中空粒子を用いてモルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討した。蛍光標識モルフォリノを界面活性剤と超音波の処理にて中空粒子に取り込ませ、限外濾過膜を用いて界面活性剤を除去し濃縮した。このモルフォリノ含有中空粒子をヒト横紋筋肉腫細胞株 RD に投与し、24 時間後に蛍光顕微鏡にて蛍光を確認した。また同様の処理によって、蛍光標識タンパク質や siRNA を中空粒子内に取り込ませるための至適条件を検証した。

さらに、9 型 AAV ベクターの生体内での動態を検証するため、筋ジストロフィー発現 9 型 AAV ベクターを投与し、安全性、免疫寛容の誘導や呼吸循環機能の評価した。

C. 研究成果

1. 改変 U7 snRNA

①U7snRNA 発現カセットの繰り返し、②上流の c5-12 エンハンサー、③ITR の scAAV 化、の 3 種類の工夫を加えた AAV ベクタープラスミドを構築した。スキップ効率を向上させる目的でエクソン 51 を標的とする snRNA の発現カセットを AAV ベクタープラスミドへの搭載許容サイズの限界付近まで繰り返しで搭載させ、合計 11 個の snRNA 発現カセットを搭載した AAV ベクタープラスミドを構築した。このプラスミドを用いて AAV ベクターを作製し、MyoD を用いて筋分化させたヒト線維芽細胞 WI-38 に感染させてエクソン 51 スキップを確認した。一方、繰り返し配列の上流に既知の骨格筋特異的な合成プロモーターである c5-12 のエンハンサーエレメントを配置した AAV ベクタープラスミドを新たに構築した。併行して、ウイルスゲノムが二本鎖となりやすく発現効率が高い scAAV の基本コンストラクトを構築した。

一方で、スキップ効率を簡便に評価する事を目的として、ヒト DMD 患者由来の 5017 細胞に SV40 LargeT 抗原発現プラスミドを導入し、不死化細胞株(5017-T 株)を樹立した。

2. モルフォリノ含有 AAV 中空粒子

イオン交換法を用いて、心筋組織への親和性が高い 9 型 AAV の中空粒子を精製した。

蛍光標識した粒子は、細胞内に導入後、核膜周囲に集積することが観察された。また、中空粒子と蛍光標識モルフォリノを様々な比率にて混合したところ、蛍光標識モルフォリノは界面活性剤の濃度に依存して中空粒子内に取り込まれた。界面活性剤の種類によっては細胞毒性を示すものがあるが、様々な界面活性剤のなかでも Pluronic F68 を用いると細胞毒性を示さず、また中空粒子中にモルフォリノを取り込むことが可能であることが明らかになった。さらにモルフォリノを培養筋細胞に送達する条件を検討するため、モルフォ

リノ含有中空粒子を横紋筋肉腫細胞株 RD に投与したところ、24 時間後から、核内に強い蛍光が認められ、4 日間以上持続した。この結果から、9 型 AAV の中空粒子は、筋細胞の核内に効率よくモルフォリノを送達することが可能であると考えられた。一般的なモルフォリノ導入試薬である Endo-Porter を使用すると高い細胞毒性が観察されたが、中空粒子と PluronicF68 を用いた場合には、明らかな細胞毒性は認められなかった。

モルフォリノの送達に AAV 中空粒子が利用可能であることが明らかになったことから、他の低分子化合物について AAV 中空粒子の薬剤送達系としての有用性を検証した。抗体医薬の送達を念頭に、蛍光標識タンパク質(また siRNA)の取り込みを検討した。蛍光標識タンパク質として Alexa-488 標識 BSA または Alexa-488 標識抗ラット IgG 抗体を用いた。いずれもモルフォリノを中空粒子に取り込ませる際と同条件で中空粒子への取り込みが可能であり、さらに細胞への送達も確認された。

また、筋ジス犬を用いた胎児期 AAV 導入実験において、AAV ベクターを羊水内に直接投与した場合と母体に全身投与した場合の双方において胎児での AAV 感染が成立した。胎児期に AAV 感染が成立することにより、処置を行った犬は AAV に対して免疫寛容を獲得しており、治療遺伝子の長期発現とともに、呼吸循環および運動機能の改善効果を確認した。

D. 考察

現在、英国において、核酸類似物質であるモルフォリノを用いたエクソン・スキップ療法の臨床治験が行われており、米国でも臨床治験を念頭に、前臨床試験による安全性評価が開始されている。ただし、現行のモルフォリノを用いた治療技術では、心筋への導入効率および作用時間が不十分であり、これらを克服することが高い臨床的効果を得るために求められている。

本研究では、安全で心筋への導入効率が高く長時間の発現が期待できる 9 型 AAV を応用し、アンチセンス分子送達担体の開発を検討した。改変 U7 snRNA を構築し、アンチセンス分子をベクターから発現させた結果、高い効率でエクソン 51 がスキップした。また、モルフォリノ含有 AAV 中空粒子を用いた方法でも、核内への集積が認められた。今後、不死化した患者由来線維芽細胞を用いて、さらに詳細に有効性と安全性を検証することで、臨床応用に向けた課題の抽出と実用化が期待される。

E. 結論

9 型 AAV を応用した改変 U7 snRNA 発現ベクターや中空粒子は、エクソン・スキップ治療に必要なアンチセンス分子の次世代担体として有望と考えられた。治療に用いる際には、まず中空粒子を用いた人工核酸によって、候補となるアンチセンス配列の有効性と安全性を検証することが必要である。さらに、長期的な有効性や安全性が確立した時点で、アンチセンス配列を AAV ベクターに搭載し長期発現療法を続けるストラテジーが有効と期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K :Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy*. (in press)
2. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, Okada T,

- Takeda S: Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*. 20:168-177, 2012
3. Koo T, Okada T, Athanaspoulos T, Foster H, Takeda S, Dickson G: Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med*. 13:497-506, 2011
 4. Shin JH, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S: Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther*. 18:910-919, 2011
 5. Masamizu Y, Okada T, Kawasaki K, Ishibashi H, Yuasa S, Takeda S, Hasegawa I, Nakahara K: Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience*. 193:249-258, 2011

【欧文著書】

1. Okada T, Takeda S: Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Viral Gene Therapy (ed. by Ke Xu), InTech*, pp225-240, 2011

II 学会発表

<国外>

【国際学会】

1. Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Chiyo T, Okada T, Takeda S: Immune tolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin transduction. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.21, 2011
2. Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M,

Nakamura A, Okada T, Takeda S: Long-term engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells in dog with Duchenne muscular dystrophy. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011

<国内>

【一般学会】

1. Hayashita-Kinoh H, Okada H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: AVV empty capsids mediate effective nuclear transportation of morpholino in the muscle cells. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.17, 2011
2. Ishii A, Okada H, Hayashita-Kinoh H, Shin JH, Okada T, Takeda S: Effective transgene expression in non-human primate muscle with AVV type9 vectors following immune suppression. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.17, 2011
3. Okada H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Hohjoh H, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Disruption of common marmoset dystrophin mRNA to generate non-human primate DMD model. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.16, 2011
4. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Nishiyama A, Okada T, Takeda S: Dystrophic mdx mice are severely compromised with cardiac and respiratory dysfunction by genetic ablation of anti-inflammatory cytokine IL-10. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.15, 2011
5. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K: Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. 第17回日本遺伝子治療学会学術集会, 福岡, 7.15, 2011

【その他】

1. 岡田尚巳: 筋ジストロフィーモデルマー

- モセットの開発. 精神・神経疾患開発費
神経・筋疾患の解明のための霊長類モデル
開発に関する研究 平成 23 年度班会議,
東京, 12.21, 2011
2. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也,
小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田
直子, 岡田尚巳: Duchenne 型筋ジストロ
フィー・モデル犬 CXMDJ における疾患
重症度と修飾因子の解析. 精神・神経疾
患研究開発費「筋ジストロフィーに対す
るトランスレーショナル・リサーチ」(主
任研究者 武田伸一)平成 23 年度班会議,
東京, 12.2, 2011
 3. 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田
浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: ベ
クターを用いた筋ジストロフィー犬免疫
寛容誘導療法と機能解析. 精神・神経疾
患研究開発費「筋ジストロフィーに対す
るトランスレーショナル・リサーチ」(主
任研究者 武田伸一)平成 23 年度班会議,
東京, 12.2, 2011
 4. 笠原優子, 喜納裕美, 岡田浩典, 岡田尚
巳, 武田伸一: IL-10 欠損 mdx マウスの
作出と病態解析. 国立精神・神経医療研
究センター神経研究所 研究所発表会,
東京, 5.9, 2011
 5. 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典, 笠原
優子, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: 9
型 AAV ベクターを用いた筋ジストロ
フィー犬胎仔への遺伝子導入と免疫寛容
の誘導. 国立精神・神経医療研究セン
ター神経研究所 研究所発表会, 東京,
5.9, 2011
 6. 岡田尚巳: 遺伝子治療基盤技術の開発と
応用. NCNP てんかんセンターリサーチ
カンファランス, 東京, 4.14, 2011

(Gene introduction efficiency enhancer)」

出願

- 1) 岡田尚巳, 千代智子, 武田伸一
薬剤取り込み増強剤
特願 2012-078035, 2012 年 3 月 29 日
出願
 - 2) 武田伸一, 中村昭則, 小林正典, 岡田
尚巳
筋ジストロフィーの病態および治療
評価のための分子マーカー
特願 2011-142312, 2011 年 6 月 27 日
出願
 - 3) 岡田尚巳, 武田伸一, 喜納裕美
薬剤送達粒子及びその製造方法
特願 2011-092252, 2011 年 4 月 18 日
出願
2. 実用新案登録
なし
 3. その他、特記事項
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

成立特許

1. 米国特許

特許番号: US7988957B2

2011 年 8 月 2 日成立

発明者: 岡田尚巳, 小澤敬也

発明の名称: 「遺伝子導入効率増強剤

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究推進研究事業))
分担研究報告書

Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers を用いた
ヒトジストロフィン遺伝子変異集積領域でのスキップの試みに関する研究

研究分担者 永田 哲也
国立精神・神経センター神経研究所
遺伝子疾患治療研究部 室長

研究要旨

ジストロフィン変異集積領域に位置するエクソンはエクソン・スキップ対象患者数の上位を占める。今回我々は、エクソン 53 以外の変異集積領域のエクソンについて従来の報告以上の高効率のスキップ活性を持つ塩基配列をスクリーニングし、決定した(特許申請中)。今後、これらの塩基配列を用いてエクソン 45-55 ブロック・スキップへの応用を検討する。

A. 研究目的

現在、Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) を対象に、アンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) の全身投与による、ジストロフィン遺伝子エクソン 51 スキップの国際共同治験が行われている。しかしながら、単一のエクソンを標的にしたエクソン・スキップは、治療対象となる患者数が少なく、しかもそれぞれの遺伝子変異に応じた AO が必要になるという問題があった。仮に、ジストロフィン欠失変異の集中するエクソン 45-55 領域を標的にしたエクソン 45-55 ブロック・スキップを行うことができれば、対象患者数が欠失を有する DMD の 63%と拡大する。またデータベースから非常に軽症な表現型を呈すると考えられる。今後、ヒトでもエクソン 45-55 ブロック・スキップを検討する必要がある。そのために同領域で、単独エクソン・スキップでも対象患者の多い 44、45、50、51、55 についてまず効果的な塩基配列のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

これまでに、西オーストラリア大学の Steve Wilton らによって 79 個全てのエクソンに対してエクソン・スキッピングを誘導するアン

チセンス核酸が作製されており、オランダの Annemieke Aartsma-Rus らによって 39 種類のエクソンに対してエクソン・スキッピングを誘導するアンチセンス核酸が作られている。これらをコントロールとして新たにエクソン 44、45、50、51、55 に対して、数十種類のアンチセンスをデザインした。その上でデザインしたアンチセンスと既報告で高効率のアンチセンスをヒト横紋筋肉腫由来細胞に nucleofector にて導入し、3 日後に RT-PCR 法によりスキッピング活性を測定した。

C. 研究成果

エクソン 44、45、50、55 に対して従来の報告の配列よりも効果的な塩基配列を決定した(特許申請中)。エクソン 51 に関しては既報告の配列が最も効率良くスキッピングを起こした。

D. 考察

エクソン 51 以外では上記に示したエクソンにおいて、より高効率でスキップを起こす塩基配列を同定した。今後、対象患者で効果を確認する。また変異集積領域の他のエクソンに関しても今後、スクリーニングを行い 45-55 ブロック・スキップに向けた準備を行う。

E. 結論

本研究の結果は、今後、予定される DMD を対象にしたエクソン・スキップ治療の可能性を広げると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yamada T, Okaniwa N, Saneyoshi H, Ohkubo A, Seio K, Nagata T, Aoki Y, Takeda S, Sekine M: Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl]ribonucleosides Using Oxa-Michael reaction and chemical and biological properties of oligonucleotide derivatives incorporating these modified ribonucleosides. *J Org Chem.* 76: 3042-3053, 2011

【欧文著書】

1. Nagata T, Takeda S: The frontier of antisense oligonucleotide induced therapy (ed. by Takeda S). Fifty years of neuromuscular disorder research after discovery of creatine kinase as a diagnostic marker of muscular dystrophy, *IGAKU-SHOIN Ltd.*, Japan, pp56-67, 2011

II 学会発表

<国外>

【国際学会】

1. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, Takeda S: Mechanism of uptaking Morpholino into dystrophin-deficient muscle fibers. American society of gene & cell therapy 14th Annual meeting, Seattle, USA, 5.20, 2011
2. Aoki Y, Nagata T, Shimizu Y, Takeda S: Challenges for antisense oligonucleotide-based therapeutics, in particular for exon 51-skipping in Duchenne

muscular dystrophy. 4th International conference on modeling, simulation and applied optimization. Kuala Lumpur, Malaysia, 4.21, 2011

<国内>

【一般学会】

1. 永田哲也, 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 武田伸一: アンチセンス・モルフォリノによるジストロフィン遺伝子エクソン 53 スキッピングの試み. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.19, 2011
2. 青木吉嗣, 清水裕子, 中村昭則, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノ人工核酸が筋線維に取り込まれる機構の解明. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.18, 2011

【その他】

1. 武田伸一, 倉岡睦季, 木村 円, 永田哲也, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田直子, 岡田尚巳: Duchenne 型筋ジストロフィー・モデル犬 CXMDJ における疾患重症度と修飾因子の解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 23 年度班会議, 東京, 12.2, 2011
2. 武田伸一, 青木吉嗣, 永田哲也, 横田俊文, Terence Partridge: 新規アンチセンス治療法開発に向けた筋線維への核酸取り込み機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
3. 横田俊文, 青木吉嗣, 永田哲也, 中村昭則, 齊藤 崇, Kanneboyina Nagaraju, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: エクソン 45-55 マルチ・スキッピングによるジストロフィン発現誘導と治療法の開発. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011
4. 関根光雄, 横内 瑛, 岡庭夏己, 正木慶昭,

原川太郎, 鈴木 真, 山田剛史, 山田 研, 大窪章寛, 清尾康志, 青木吉嗣, 永田哲也, 武田伸一: 遺伝子制御機能を持つ人工核酸の創出. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者武田伸一)平成 23 年度班会議, 東京, 12.1, 2011

5. 青木吉嗣, 横田俊文, 永田哲也, 谷端 淳, 齊藤 崇, 中村昭則, Eric Hoffman, Terence Partridge, 武田伸一: モルフォリノを用いたエクソン 45-55 ブロックスキップにより Duchenne 型筋ジストロフィーマウスの筋病理と筋機能は改善する. 第 6 回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会, 熊本, 11.5, 2011
6. 永田哲也: 筋ジストロフィー治療研究の進歩. 第 8 回筋ジストロフィー市民公開講座, 東京, 7.2, 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許

出願

- 1) 武田伸一, 永田哲也, 他 2 名
アンチセンス核酸
特願 2011-288040, 2011 年 9 月 1 日出願
2. 実用新案登録
なし
3. その他、特記事項
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u>	Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.	Ke Xu	Viral Gene Therapy	InTech	Croatia	2011	225-240

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito M, Suzuki Y, <u>Okada T</u> , Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, <u>Takeda S</u> , Krejci E, Ohno K	Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction.	<i>Mol Ther.</i>		in press	
Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, <u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u>	Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy.	<i>Mol Ther.</i>	20	168-177	2012
Koo T, <u>Okada T</u> , Athanasopoulos T, Foster H, <u>Takeda S</u> , Dickson G	Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog.	<i>J Gene Med.</i>	13	497-506	2011
Shin JH, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, <u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u>	Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction.	<i>Gene Ther.</i>	18	910-919	2011
Masamizu Y, <u>Okada T</u> , Kawasaki K, Ishibashi H, Yuasa S, <u>Takeda S</u> , Hasegawa I, Nakahara K	Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9.	<i>Neuroscience.</i>	193	249-258	2011

Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy

Takashi Okada and Shin'ichi Takeda

*National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry
Japan*

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common form of childhood muscular dystrophy. DMD is an X-linked recessive disorder with an incidence of one in 3500 live male births (Emery, 1991). DMD causes progressive degeneration and regeneration of skeletal and cardiac muscles due to mutations in the *dystrophin* gene, which encodes a 427-kDa subsarcolemmal cytoskeletal protein (Hoffman et al., 1987). DMD is associated with severe, progressive muscle weakness and typically leads to death between the ages of 20 and 35 years. Due to recent advances in respiratory care, much attention is now focused on treating the cardiac conditions suffered by DMD patients.

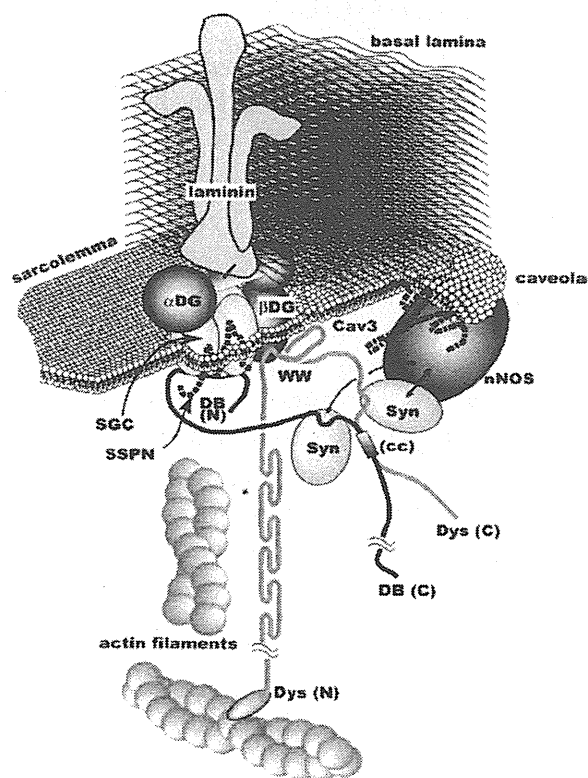


Fig. 1. Dystrophin-glycoprotein complex.

Molecular structure of the dystrophin-glycoprotein complex and related proteins superimposed on the sarcolemma and subsarcolemmal actin network (redrawn from Yoshida *et al.* (Yoshida *et al.*, 2000), with modifications). cc, coiled-coil motif on dystrophin (Dys) and dystrobrevin (DB); SGC, sarcoglycan complex; SSPN, sarcospan; Syn, syntrophin; Cav3, caveolin-3; N and C, the N and C termini, respectively; G, G-domain of laminin; asterisk indicates the actin-binding site on the dystrophin rod domain; WW, WW domain.

The approximately 2.5-megabase *dystrophin* gene is the largest gene identified to date, and because of its size, it is susceptible to a high sporadic mutation rate. Absence of dystrophin and the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) from the sarcolemma leads to severe muscle wasting (Figure 1). Whereas DMD is characterized by the absence of functional protein, Becker muscular dystrophy, which is commonly caused by in-frame deletions of the *dystrophin* gene, results in the synthesis of a partially functional protein.

2. Gene-replacement strategies using virus vectors

2.1 Choice of vector

Successful therapy for DMD requires the restoration of dystrophin protein in skeletal and cardiac muscles. While various viral vectors have been considered for the delivery of genes to muscle fibers, the adeno-associated virus (AAV)-based vector is emerging as the gene transfer vehicle with the most potential for use in DMD gene therapies. The advantages of the AAV vector include the lack of disease associated with a wild-type virus, the ability to transduce non-dividing cells, and the long-term expression of the delivered transgenes (Okada *et al.*, 2002). Serotypes 1, 6, 8 and 9 of recombinant AAV (rAAV) exhibit a potent tropism for striated muscles (Inagaki *et al.*, 2006). Since a 5-kb genome is considered to be the upper limit for a single AAV virion, a series of rod-truncated micro-dystrophin genes is used in this treatment (Yuasa *et al.*, 1998).

Due to ingenious cloning and preparation techniques, adenovirus vectors are efficient delivery systems of episomal DNA into eukaryotic cell nuclei (Okada *et al.*, 1998). The utility of adenovirus vectors has been increased by capsid modifications that alter tropism, and by the generation of hybrid vectors that promote chromosomal insertion (Okada *et al.*, 2004). Also, gutted adenovirus vectors devoid of all adenoviral genes allow for the insertion of large transgenes, and trigger fewer cytotoxic and immunogenic effects than do those only deleted in the E1 regions (from bases 343 to 2270) (Hammerschmidt, 1999). Human artificial chromosomes (HACs) have the capacity to deliver a large gene (roughly 6-10 megabases) into host cells without integrating the gene into the host genome, thereby preventing the possibility of insertional mutagenesis and genomic instability (Hoshiya *et al.*, 2008).

A goal in clinical gene therapy is to develop gene transfer vehicles that can integrate exogenous therapeutic genes at specific chromosomal loci, so that insertional oncogenesis is prevented. AAV can insert its genome into a specific locus, designated AAVS1, on chromosome 19 of the human genome (Kotin *et al.*, 1992). The AAV Rep78/68 proteins and the Rep78/68-binding sequences are the trans- and cis-acting elements needed for this reaction. A dual high-capacity adenovirus-AAV hybrid vector with full-length human dystrophin-coding sequences flanked by AAV integration-enhancing elements was tested for targeted integration (Goncalves *et al.*, 2005).

Gene correction is a process whereby sequence alterations in genes can be corrected by homologous recombination-mediated gene conversion between the recipient target locus

and a donor construct encoding the correct sequence (Klug, 2005). The introduction of a corrective sequence together with a site-specific nuclease to induce a double-stranded break (DSB) at sites responsible for monogenic disorders would activate gene correction. Pairs of designated zinc-finger protein with tandem DNA binding sites fused to the cleavage domain of the Fok1 protein were introduced into model systems or cell lines and produced corrections in 10–30% of cases tested (Porteus and Baltimore, 2003).

2.2 Modification of the dystrophin gene and promoter

Due to the large deletion in its genome, the gutted adenovirus vector can package 14-kb of full-length *dystrophin* cDNA. Multiple proximal muscles of seven-day-old utrophin/dystrophin double knockout mice (*dko* mice), which typically show symptoms similar to human DMD, were effectively transduced with the gutted adenovirus bearing full-length murine *dystrophin* cDNA (Kawano et al., 2008). However, further improvements are needed to regulate the virus-associated host immune response before clinical trials can be performed.

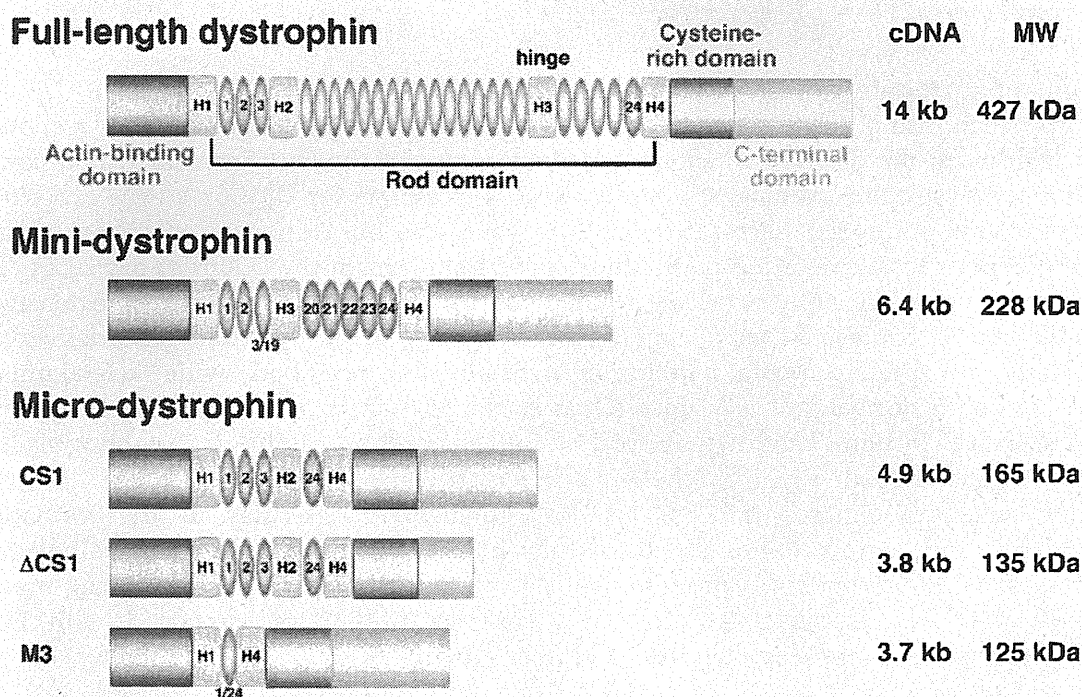


Fig. 2. Structures of full-length and truncated dystrophin.

Helper-dependent adenovirus vector can package 14-kb of full-length dystrophin cDNA because of the large-sized deletion in its genome. A mini-dystrophin is cloned from a patient with Becker muscular dystrophy, which is caused by in-frame deletions resulting in the synthesis of partially functional protein. A series of truncated micro-dystrophin cDNAs harboring only four rod repeats with hinge 1, 2, and 4 (CS1); the same components, except that the C-terminal domain is deleted (delta CS1); or one rod repeat with hinge 1 and 4 (M3), are constructed to be packaged in the AAV vector.

A series of truncated *dystrophin* cDNAs containing rod repeats with hinge 1, 2, and 4 were constructed (Figure 2) (Yuasa et al., 1998). Although AAV vectors are too small to package

the full-length *dystrophin* cDNA, AAV vector-mediated gene therapy using a rod-truncated *dystrophin* gene provides a promising approach (Wang et al., 2000). The structure and, particularly, the length of the rod are crucial for the function of micro-dystrophin (Sakamoto et al., 2002). An AAV type 2 vector expressing micro-dystrophin (DeltaCS1) under the control of a muscle-specific MCK promoter was injected into the tibialis anterior (TA) muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice (Yoshimura et al., 2004), and resulted in extensive and long-term expression of micro-dystrophin that exhibited improved force generation.

The impact of codon usage optimization on micro-dystrophin expression and function in the *mdx* mouse was assessed to compare the function of two different configurations of codon-optimized *micro-dystrophin* genes under the control of a muscle-restrictive promoter (Spc5-12) (Foster et al., 2008). Codon optimization of micro-dystrophin significantly increased micro-dystrophin mRNA and protein levels after intramuscular and systemic administration of plasmid DNA or rAAV8. By randomly assembling myogenic regulatory elements into synthetic promoter recombinant libraries, several artificial promoters were isolated whose transcriptional potencies greatly exceed those of natural myogenic and viral gene promoters (Li et al., 1999).

2.3 Use of surrogate genes

An approach using a surrogate gene would bypass the potential immune responses associated with the delivery of exogenous dystrophin. Methods to increase expression of utrophin, a dystrophin paralog, show promise as a treatment for DMD. rAAV6 harboring a murine codon-optimized micro-utrophin transgene was intravenously administered into adult *dko* mice to alleviate the pathophysiological abnormalities (Odom et al., 2008). The paralogous gene efficiently acted as a surrogate for *dystrophin*. Myostatin is extensively documented as being a negative regulator of muscle growth. Systemic gene delivery of myostatin propeptide, a natural inhibitor of myostatin, enhanced body-wide skeletal muscle growth in both normal and *mdx* mice (Qiao et al., 2008). The delivery of various growth factors, such as insulin-like growth factor-I (IGF-I), has been successful in promoting skeletal muscle regeneration after injury (Schertzer and Lynch, 2006).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are key regulatory molecules in the formation, remodeling and degradation of all extracellular matrix (ECM) components in pathological processes. MMP-9 is involved predominantly in the inflammatory process during muscle degeneration (Fukushima et al., 2007). In contrast, MMP-2 is associated with ECM remodeling during muscle regeneration and fiber growth.

3. AAV-mediated transduction of animal models

3.1 Vector production

When adenovirus helper plasmid is co-transfected into human embryonic kidney 293 cells along with a vector plasmid encoding the AAV vector and an AAV packaging plasmid harboring *rep-cap* genes, the AAV vector is produced as efficiently as when using adenovirus infection. A large-scale transduction method to produce AAV vectors with an active gassing system makes use of large culture vessels for labor- and cost-effective transfection in a closed system. Samples containing vector particles are further purified with a two-tier CsCl gradient or dual ion-exchange chromatography to obtain highly purified vector particles.

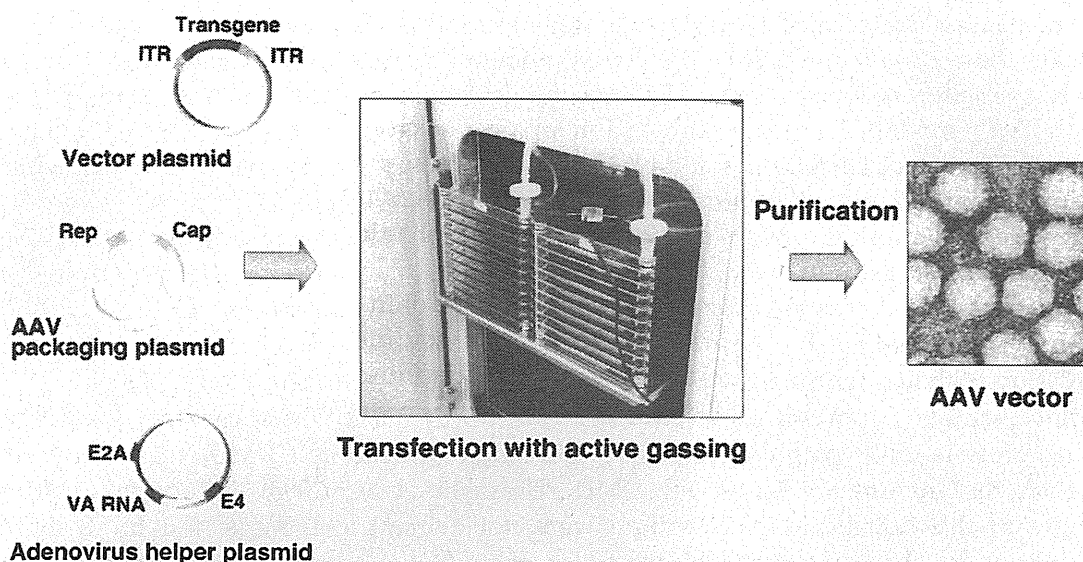


Fig. 3. A scalable triple plasmid transfection system using active gassing.

To gain acceptance as a medical treatment with a dose of over 1×10^{13} genome copies (g.c.)/kg body weight, AAV vectors require a scalable and economical production method. A production protocol of AAV vectors in the absence of a helper virus (Matsushita et al., 1998) is widely employed for triple plasmid transduction of human embryonic kidney 293 cells (Okada et al., 2002). The adenovirus regions that mediate AAV vector replication (namely, the VA, E2A and E4 regions) were assembled into a helper plasmid. When this helper plasmid is co-transfected into human embryonic kidney 293 cells along with plasmids encoding the AAV vector genome and *rep-cap* genes, the AAV vector is produced as efficiently as when using adenovirus infection (Figure 3). Importantly, contamination of most adenovirus proteins can be avoided in AAV vector stock made by this helper virus-free method. Samples containing vector particles are further purified with a two-tier CsCl gradient or dual ion-exchange chromatography to obtain highly purified vector particles (Okada et al., 2002).

Despite improvements in vector production, including the development of packaging cell lines expressing Rep/Cap, and of methods that induce the expression and regulation of Rep/Cap (Okada et al., 2001), maintaining such cell lines remains difficult, as the early expression of Rep proteins is toxic to cells. A scalable method, using active gassing and large culture vessels, was developed to transfect rAAV in a closed system, in a labor- and cost-effective manner (Okada et al., 2005). This vector production system achieved a yield of more than 5×10^{13} g.c./flask by improving gas exchange to maintain the physiological pH in the culture medium. Recent developments in ion-exchange chromatography also suggest that vector production using transduction culture supernatant would be compatible with current good manufacturing practice and production on an industrial scale (Okada et al., 2009). Moreover, AAV vector production in insect cells would be compatible with current good manufacturing practice production on an industrial scale (Cecchini et al., 2008).

3.2 Animal models for the gene transduction study

Dystrophin-deficient canine X-linked muscular dystrophy was found in a golden retriever with a 3' splice-site point mutation in intron 6 (Valentine et al., 1988). The clinical and

pathological characteristics of dystrophic dogs are more similar to those of DMD patients than are those of *mdx* mice. A beagle-based model of canine X-linked muscular dystrophy, which is smaller and easier to handle than the golden retriever-based muscular dystrophy dog (GRMD) model, has been established in Japan, and is referred to as CXMD_J (Shimatsu et al., 2005). The limb and temporal muscles of CXMD_J are affected by two-month-old, which is the age corresponding to the second peak of serum creatine kinase.

Interestingly, we found extensive lymphocyte-mediated immune responses to rAAV2-*lacZ* after direct intramuscular injection into CXMD_J dogs, despite successful delivery of the same viral construct into mouse skeletal muscle (Yuasa et al., 2007). In contrast to rAAV2, rAAV8-mediated transduction of canine skeletal muscles produced significantly higher transgene expression with less lymphocyte proliferation than rAAV2 (Ohshima et al., 2008).

It is increasingly important to develop strategies to treat DMD that consider the effect on cardiac muscle. The pathology of the conduction system in CXMD_J was analyzed to establish the therapeutic target for DMD (Urasawa et al., 2008). Although dystrophic changes of the ventricular myocardium were not evident at the age of 1 to 13 months, Purkinje fibers showed remarkable vacuolar degeneration when dogs were as young as four-months-old. Furthermore, degeneration of Purkinje fibers was coincident with overexpression of Dp71 at the sarcolemma. The degeneration of Purkinje fibers could be associated with the distinct deep Q waves present in ECGs and the fatal arrhythmias seen in cases of dystrophin deficiency (Urasawa et al., 2008).

3.3 Immunological Issues of rAAV

Neo-antigens introduced by AAV vectors evoke significant immune reactions in DMD muscle, since increased permeability of sarcolemma allows leakage of the transgene products from the dystrophin-deficient muscle fibers (Yuasa et al., 2002). rAAV2 transfer into skeletal muscles of normal dogs resulted in low and transient expression, together with intense cellular infiltration, and the marked activation of cellular and humoral immune responses (Yuasa et al., 2007). Furthermore, an *in vitro* interferon-gamma release assay showed that canine splenocytes respond to immunogens or mitogens more strongly than do murine splenocytes. In fact, co-administration of immunosuppressants, cyclosporine (CSP) and mycophenolate mofetil (MMF) improved rAAV2 transduction. The AAV2 capsids can induce a cellular immune response via MHC class I antigen presentation with a cross-presentation pathway, and rAAV2 has also been proposed to have an effect on human dendritic cells (DCs). In contrast, other serotypes, such as rAAV8, induced T-cell activation to a lesser degree (Ohshima et al., 2008). Immunohistochemical analysis revealed that the rAAV2-injected muscles showed higher rates of infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the endomysium than the rAAV8-injected muscles (Ohshima et al., 2008).

Resident antigen-presenting cells, such as DCs, myoblasts, myotubes and regenerating immature myofibers, might play a role in the immune response. A recent study also showed that mRNA levels of MyD88 and co-stimulating factors, such as CD80, CD86 and type I interferon, are elevated in both rAAV2- and rAAV8-transduced dog DCs *in vitro* (Ohshima et al., 2008). A brief course of immunosuppression with a combination of anti-thymocyte globulin (ATG), CSP and MMF was effective in permitting AAV6-mediated, long-term and robust expression of a canine micro-dystrophin in the skeletal muscle of a dog DMD model (Wang et al., 2007).

3.4 Intravascular vector administration by limb perfusion

Although recent studies suggest that vectors based on AAV are capable of body-wide transduction in rodents, translating this finding into large animals remains a challenge. Intravascular delivery can be performed as a form of limb perfusion, which might bypass the immune activation of DCs in the injected muscle (Ohshima et al., 2008). We performed limb perfusion-assisted intravenous administration of rAAV8-lacZ into the hind limb of normal dogs and rAAV8-micro-dystrophin into the hind limb of CXMD_J dogs (Figure 4) (Ohshima et al., 2008). Administration of rAAV8-micro-dystrophin by limb perfusion produced extensive transgene expression in the distal limb muscles of CXMD_J dogs without obvious immune responses for as long as eight weeks after injection.

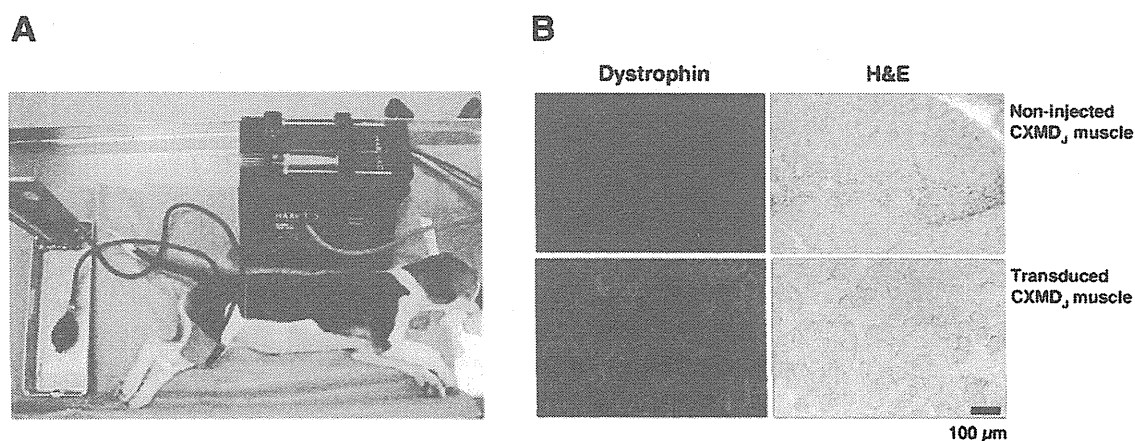


Fig. 4. Intravascular vector administration by limb perfusion.

(A) A blood pressure cuff is applied just above the knee of an anesthetized CXMD_J dog. A 24-gauge intravenous catheter is inserted into the lateral saphenous vein, connected to a three-way stopcock, and flushed with saline. With a blood pressure cuff inflated to over 300 mmHg, saline (2.6 ml/kg) containing papaverine (0.44 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and heparin (16 U/kg) is injected by hand over a 10 second period. The three-way stopcock is connected to a syringe containing rAAV8 expressing micro-dystrophin (1×10^{14} vg/kg, 3.8 ml/kg). The syringe is placed in a PHD 2000 syringe pump (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK). Five minutes after the papaverine/heparin injection, rAAV8 is injected at a rate of 0.6 ml/sec. (B) Administration of rAAV8-micro-dystrophin by limb perfusion produces extensive transgene expression in the distal limb muscles of CXMD_J dogs without obvious immune responses at four weeks after injection.

3.5 Global muscle therapies

In comparison with fully dystrophin-deficient animals, targeted transgenic repair of skeletal muscle, but not cardiac muscle, paradoxically elicits a five-fold increase in cardiac injury and dilated cardiomyopathy (Townsend et al., 2008). Because the dystrophin-deficient heart is highly sensitive to increased stress, increased activity by the repaired skeletal muscle provides the stimulus for heightened cardiac injury and heart remodeling. In contrast, a single intravenous injection of AAV9 vector expressing micro-dystrophin efficiently transduces the entire heart in neonatal *mdx* mice, thereby ameliorating cardiomyopathy (Bostick et al., 2008).

Since a number of muscular dystrophy patients can be identified through newborn screening, neonatal transduction may lead to an effective early intervention in DMD patients. After a single intravenous injection, robust skeletal muscle transduction with AAV9 vector throughout the body was observed in neonatal dogs (Yue et al., 2008). Systemic transduction was achieved in the absence of pharmacological intervention or immune suppression and lasted for at least six months, whereas cardiac muscle was barely transduced in the dogs.

4. Safety and potential impact of clinical trials

The initial clinical studies lay the foundation for future studies, providing important information about vector dose, viral serotype selection, and immunogenicity in humans. The first virus-mediated gene transfer for muscle disease was carried out for limb-girdle muscular dystrophy type 2D using rAAV1. The study, consisting of intramuscular injection of virus into a single muscle, was discharged to establish the safety of this procedure in phase I clinical trials (Rodino-Klapac et al., 2007). The first clinical gene therapy trial for DMD began in March 2006 (Mendell et al., 2010). This was a Phase I/IIa study in which an AAV vector was used to deliver micro-dystrophin to the biceps of boys with DMD. The study was conducted on six boys with DMD, each of whom was transduced with mini-dystrophin genes in a muscle of one arm in the absence of serious adverse events. Interestingly, dystrophin-specific T cells were detected after treatment, providing evidence of transgene expression. The potential for T-cell immunity to self and nonself dystrophin epitopes should be considered in designing and monitoring experimental therapies for this disease.

While low immunogenicity was considered a major strength supporting the use of rAAV in clinical trials, a number of observations have recently provided a more balanced view of this procedure (Manno et al., 2006). An obvious barrier to AAV transduction is the presence of circulating neutralizing antibodies that prevent the virion from binding to its cellular receptor (Scallan et al., 2006). This potential threat can be reduced by prescreening patients for AAV serotype-specific neutralizing antibodies or by performing procedures such as plasmapheresis before gene transfer. Another challenge recently revealed is the development of a cell-mediated cytotoxic T-cell (CTL) response to AAV capsid peptides. In the human factor IX gene therapy trial in which rAAV was delivered to the liver, only short-term transgene expression was achieved and levels of therapeutic protein declined to baseline levels 10 weeks after vector infusion (Manno et al., 2006). This was accompanied by elevation of serum transaminase levels and a CTL response toward specific AAV capsid peptides. To overcome this response, transient immunosuppression may be required until AAV capsids are completely cleared. Additional findings suggest that T-cell activation requires AAV2 capsid binding to the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) receptor, which would permit virion shuttling into a DC pathway, as cross-presentation (Vandenberghe et al., 2006). Exposure to vectors from other AAV clades, such as AAV8, did not activate capsid-specific T-cells.

5. Challenges and limitations of related strategies

5.1 Design of read-through drugs

To suppress premature stop codon mutations, treatments involving aminoglycosides and other agents have been attempted. PTC124, a novel drug capable of suppressing premature